

具拮抗能力放線菌菌株之鑑定與防治馬鈴薯瘡痂病效果評估

林靜宜^{1,*} 倪蕙芳² 林慧如³

摘要

林靜宜、倪蕙芳、林慧如。2020。具拮抗能力放線菌菌株之鑑定與防治馬鈴薯瘡痂病效果評估。台灣農業研究 69(2):122–131。

馬鈴薯瘡痂病為嚴重影響馬鈴薯產量與品質之重要病害之一，目前並無有效之防治藥劑可用，而輪作及抗病品種等耕作防治法效果亦有限。因此，本研究自高雄不同地區之土壤分離純化 85 株放線菌後，以玻璃紙抗生法於培養基上初步篩選對馬鈴薯瘡痂病菌 *Streptomyces europaeiscabiei* 具有拮抗活性之菌株，再利用拮抗菌株之培養濾液進一步測試其拮抗活性。結果發現，菌株 35-2 與 43-21 對 *S. europaeiscabiei* 病原之拮抗能力最佳。進一步利用 16S rRNA 基因序列分析後初步鑑定 35-2 與 43-21 菌株為鏈黴菌 *Streptomyces rochei* 與 *Streptomyces neopeptinius*。溫室試驗結果亦顯示，以菌株 35-2 與 43-21 之培養濾液澆灌馬鈴薯植株後，薯塊之罹病度分別為 28.0% 及 35.0%，明顯低於對照組之罹病度 61.5%。由此顯示，此兩拮抗菌株具有降低薯塊發生馬鈴薯瘡痂病罹病度之潛力，同時此兩株拮抗菌具有促進馬鈴薯薯塊生長的效果。

關鍵詞：馬鈴薯瘡痂病、鏈黴菌、生物防治。

前言

馬鈴薯瘡痂病 (common scab) 為馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.) 重要之細菌性土傳性病害，廣泛存在於世界各地之馬鈴薯產區。本病的病原菌為放線菌中具有致病性的鏈黴菌 (*Streptomyces* spp.)，已知主要的病原菌種類包含：*Streptomyces scabies* (Lambert & Loria 1989b)、*Streptomyces acidiscabies* (Lambert & Loria 1989a)、*Streptomyces turgidiscabies* (Miyajima *et al.* 1998) 及 *Streptomyces europaeiscabiei* (Bouchek-Mechiche *et al.* 2000)，其他鏈黴菌屬之 *Streptomyces bottropensis*、*Streptomyces stelliscabiei* 及 *Streptomyces aureofaciens* 等亦有報導指出可造成馬鈴薯瘡痂病的發生 (Leiminger *et al.* 2013)。這些病原菌危害馬鈴薯後所產生的病徵，主要為薯塊表面出現木栓化、瘡痂狀或疣狀的褐色病斑，嚴重時病斑相互癒合並呈網狀

龜裂，導致馬鈴薯外觀及品質降低且不耐儲藏，嚴重影響馬鈴薯鮮食及加工的市場銷售價，造成重大的經濟損失。

馬鈴薯瘡痂病之病原菌除了可存活於罹病薯塊殘體，亦可藉腐生方式生存於土壤中，導致此病害之防治與管理至今仍是個棘手的問題。傳統的防治方法如輪作、管理土壤水分、利用土壤改良劑調整土壤 pH、土壤燻蒸消毒或是於種植前利用藥劑處理種薯等方式，其防治成效通常不穩定，甚至有些方法對於作物生長與生態環境多有損害 (Larkin *et al.* 2011; Dees & Wanner 2012)。抗病品種為對抗病害的有效方式之一，雖然馬鈴薯品種繁多，且已篩選出對馬鈴薯瘡痂病具有不同程度抗性之品種，然而截至目前為止並未發現具有完全抗性 (免疫) 之品種 (Goth *et al.* 1993; Dees & Wanner 2012)。近年來，生物防治法蓬勃

投稿日期：2019 年 9 月 5 日；接受日期：2019 年 12 月 17 日。

* 通訊作者：eris2024@dns.caes.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣嘉義市。

² 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣嘉義市。

³ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系計畫助理。台灣嘉義市。

發展，已有不少鏈黴菌應用於植物病害防治的成功案例，亦有些成功開發成商品化之植物保護製劑，如 Actinovate® (*Streptomyces lydicus* WYEC 108) 及 Mycostop® (*Streptomyces griseoviridis* K61) 等。台灣目前也有登記用於疫病等病害防治的純白鏈黴菌 (*Streptomyces candidus* Y21007) 商品化產品如安心寶® 等。這些例子也提供了馬鈴薯瘡痂病防治策略另一種具有發展潛力的新興防治途徑。

利用拮抗菌防治馬鈴薯瘡痂病的相關研究方面，目前已發現除了以無病原性鏈黴菌 (non-pathogenic *Streptomyces* spp.) (Hiltunen *et al.* 2009; Wanner *et al.* 2014; Sarwar *et al.* 2018; Sarwar *et al.* 2019) 作為拮抗菌具有抑制馬鈴薯瘡痂病菌生長的能力，可提供生物防治的效果之外，利用假單胞菌 (*Pseudomonas* spp.) (Arseneault *et al.* 2015) 與芽孢桿菌 (*Bacillus* spp.) (Meng *et al.* 2013; Lin *et al.* 2018a) 作為生物防治菌，亦對馬鈴薯瘡痂病菌具有拮抗效果。而就馬鈴薯瘡痂病菌而言，雖以 *S. scabiei* 最廣為熟知，但近年來已陸續發現多種具有病原性之鏈黴菌亦可引起馬鈴薯瘡痂病，如 *S. turgidiscabiei* 及 *S. europaeiscabiei* 等，且研究指出多種馬鈴薯瘡痂病菌可於田間發生複合感染 (Wanner 2009)。其中，*S. europaeiscabiei* 與 *S. scabiei* 於 16S 核糖體 RNA (16S ribosomal RNA; 16S rRNA) 雖具有高序列相似度，但分類上卻為不同種 (Flores-González *et al.* 2008)。目前對於 *S. europaeiscabiei* 之特性、與寄主和其他瘡痂病菌之交互作用等方面資訊所知有限，且其分布有愈來愈廣泛的趨勢。

目前除了是造成歐洲地區之馬鈴薯瘡痂病的主要病原菌之外 (Flores-González *et al.* 2008; Leiminger *et al.* 2013)，近年來亦於美國、加拿大及南韓等地發現其蹤跡 (Song *et al.* 2004; Wanner 2009; Hiltunen *et al.* 2014)，台灣則於 2015 年首次發現 (Lin *et al.* 2018b) 此病原菌之危害。因此，本研究將以 *S. europaeiscabiei* 作為研究標的，由林相土壤中篩選對其具有拮抗效果之放線菌，並於溫室中評估其防治馬鈴薯瘡痂病之效果。

材料與方法

土壤放線菌菌株之採集、分離及保存

採集高雄市甲仙、美濃、田寮及燕巢地區等不同林區根圈土壤，每份土樣之採集地點皆以 GPS 衛星定位。收集之土樣經風乾後利用孔徑 20 目 (mesh) 篩網過篩，保存於室溫下。利用土壤系列稀釋平板法分離放線菌，每一土樣稱取 10 g 加入 100 mL 無菌水攪拌 30 s，靜置後取上清液以無菌水進行 10× 系列稀釋後，分別取 10⁻⁴ 及 10⁻⁵× 之土壤稀釋液 100 μL。以 L 型玻棒均勻塗布於添加 0.02% 尿酸 (urea) 及 50 μg mL⁻¹ nystatin 之 1.5% water agar (WA) 培養基平板上，於室溫下培養 2 wk 以上。初步以培養基上菌落型態為依據，挑取疑似放線菌之菌落至添加 50 μg mL⁻¹ nystatin 的 International Streptomyces Project medium 4 培養基 (ISP-4, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 平板上純化。再以單一菌落純化 3 次後，待菌株產孢後，刮取孢子至盛裝滅菌土之保存管中供日後試驗使用 (Huang 2008)。

供試馬鈴薯瘡痂病菌與放線菌接種源之製備

本研究使用之瘡痂病菌菌株為 *S. europaeiscabiei* St1563，為本實驗室自嘉義地區罹病馬鈴薯塊上分離並以滅菌土保存其孢子 (Lin *et al.* 2018b)。將保存的瘡痂病菌畫線於 ISP-4 培養基上活化後，再以 ISP-4 培養基更新培養。於 30°C 恆溫培養箱中培養 7 d 後，刮取孢子以無菌水製成懸浮液，懸浮液利用光電比色計於 600 nm 波長下測定，調整其吸光值 (optical density; OD) 為 0.3，菌量濃度約為 10⁸ CFU mL⁻¹ (colony-forming unit; CFU) 即可作為試驗中之接種源。

放線菌與馬鈴薯瘡痂病菌之抗生測定

本試驗利用玻璃紙抗生法，進行放線菌對馬鈴薯瘡痂病菌之拮抗能力初步篩選。將純化保存之放線菌菌株，分別畫線於 ISP-4 培養基上活化後，再以 ISP-4 培養基更新培養。於 30°C 恆溫培養箱中培養 5 d 後所得之菌落，

以直徑 3 mm 打孔器切取菌塊，移至已貼有滅菌之 3.5 cm × 3.5 cm 玻璃紙的 ISP-4 培養基直徑 5.5 cm 中心點位置。於 30°C 恆溫培養箱中培養 72 h 後，將玻璃紙連同放線菌菌塊一起撕下。再將培養於 ISP-4 培養基 7 d 後之 *S. europaeiscabiei* St1563 菌株，刮取孢子以無菌水製成懸浮液，取 100 μL 以 L 型玻棒均勻塗布於前述 ISP-4 培養基。每處理 3 重複，置於 30°C 恆溫培養箱中，培養 7 d 後，取出測量抑制圈大小。

不同培養時間對放線菌培養液拮抗 *S. europaeiscabiei* St1563 能力之影響

利用放線菌小量培養之培養濾液，進行對 *S. europaeiscabiei* St1563 拮抗能力測定。以無菌水配製拮抗放線菌之孢子懸浮液，將濃度調整約為 10^8 CFU mL⁻¹。取 1 mL 之細菌懸浮液，加入裝有 100 mL 之營養液體培養基 (Luria Bertani, LB broth, Miller) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 的三角燒瓶中，置於 30°C 之恆溫震盪培養箱中培養，培養時間分為 0、7、14 及 21 d。培養之菌液以雙層紗布濾除菌體後，再利用 0.22 μm 濾膜過濾。所得之培養濾液取 200 μL 加入 9.0 cm ISP-4，培養基中心點位置已放置不鏽鋼培養環 (內圈直徑 6 mm) 之中，再以滅菌棉花棒將 *S. europaeiscabiei* St1563 之孢子懸浮液均勻塗布於前述 ISP-4 培養基。每處理 3 重複，置於 30°C 恆溫培養箱中，培養 7 d 後，取出測量抑制圈大小。

16S rRNA 基因序列分析

參考 Wang *et al.* (1993) 之方法並略加修改後進行核酸萃取，將拮抗菌株 35-2 及 43-21 於 ISP-4 培養基平板上培養 7 d 後，刮取菌落放入 50 μL 之 0.5 N NaOH，劇烈震盪後短暫離心，再加入 150 μL 之 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 混合均勻。取 10 μL 加入無菌水稀釋 10×，再以此製備液 1 μL 作為模板。利用 16S rRNA 序列設計的廣效性引子對 UniF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')/UniR (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (Edwards *et al.* 1989) 進行聚合酵素連鎖反

應 (Polymerase Chain Reaction; PCR)。反應以 PCR 試劑套組 (Fast-Run™ 2× Taq Master Mix, Protech, Taipei, Taiwan) 進行，反應總體積為 20 μL。反應條件如下：94°C 變性 1 min；94°C 變性 30 s，57°C 黏合 30 s，72°C 延伸 90 s，共 35 個循環；最後經 72°C 延伸 1 min 完成反應。反應完成後之產物，以於 1.5% 瓊脂凝膠進行電泳分析，再經電泳圖譜結果得知反應於 1,514 bp 處增幅出一特定條帶，經解序 (Tri-I Biotech Inc., Taipei, Taiwan) 後，上傳 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 資料庫進行比對。

具拮抗能力鏈黴菌防治馬鈴薯瘡痂病菌之效果

本研究以馬鈴薯栽培品種克尼伯 (*Solanum tuberosum* L. var. 'Kennebec') 作為供試植物，將已萌芽之馬鈴薯種薯切塊，每小塊至少留有 1 芽眼。切塊後置陰涼處 1 d，再種植於裝有泥炭土栽培介質之 4 吋軟盆中，生長 2 wk 後作為試驗接种植株。將具拮抗能力之菌株 35-2 及 43-21 以 LB broth 小量培養 7 d 後之培養液，經雙層紗布濾除菌體後再利用 0.22 μm 濾膜過濾。所得之培養濾液以無菌水 10× 稀釋後，利用土壤澆灌法施用於馬鈴薯植株根圈土壤。每株植物澆灌 150 mL，每 7 d 施用 1 次，連續 6 次。以未含拮抗放線菌 LB broth 濾液處理之植株作為對照組。第 1 次施用後 7 d，進行馬鈴薯瘡痂病菌接種。接種時將 50 mL 之馬鈴薯瘡痂病菌孢子懸浮液 (10^8 CFU mL⁻¹) 直接灌注根圈土壤中，每組分別接種處理 10 株馬鈴薯。本防治試驗進行 2 次。接種後的植株於溫室中生長達 8 wk 後，收取其地下部薯塊，依罹病指數 (disease index) 觀察其罹病等級及發病情形，並計算罹病度 (disease severity)。瘡痂病罹病等級分為 5 級：0 級-無病徵、1 級-1-10% 薯塊表面積出現木栓化、瘡痂狀或疣狀的褐色病斑、2 級-11-40% 薯塊表面積出現瘡痂病病斑、3 級-41-60% 薯塊表面積出現瘡痂病病斑、4 級-61-90% 薯塊表面積出現瘡痂病病斑、5 級-> 90% 薯塊表面積出現瘡痂病病斑 (Leiminger *et al.* 2013)，再依照下列公式計算其罹病度。

$$\text{Disease severity (\%)} = \frac{\sum ni \times i}{N \times 5} \times 100\% \quad (1)$$

i：發病等級

ni：發病 i 級的薯塊數

N：調查的總薯塊數

具拮抗能力鏈黴菌之培養濾液對馬鈴薯生長的影響

分別將拮抗菌株 35-2 及 43-21 之培養濾液利用土壤澆灌法處理種植 1 wk 後之馬鈴薯植株，每次澆灌 150 mL，每 7 d 施用 1 次，連續 4 次，對照組則以 150 mL LB broth 澆灌植株。每組依前述方法分別接種處理 10 株馬鈴薯，處理後的植株於溫室中生長 5 wk 後測量植株之株高、鮮重及薯塊等之生長情形。

統計分析

試驗資料利用 SAS 9.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (Fisher's least significant difference; LSD) 測驗在 5% 顯著水準下，比較處理間平均值之差異。

結果

放線菌與馬鈴薯瘡痂病菌之抗生效果

本研究自高雄市甲仙、美濃、田寮、燕巢、杉林及那瑪夏地區之土壤分離篩選出 85 株放線菌，利用玻璃紙抗生法初步篩選對 *S. europaeiscabiei* St1563 具有拮抗能力之菌株。結果顯示，其中 18 株菌株具有抑制 *S. europaeiscabiei* St1563 生長的效果，分別分離自甲仙、美濃、田寮、燕巢及杉林，惟那瑪夏地區未篩選出具有拮抗能力之菌株 (表 1)。進一步將菌株抑制效果區分為抑制圈小於 1 cm (antagonistic activity index = 1)、抑制圈介於 1–2 cm 之間 (antagonistic activity index = 2)、抑制圈介於 2–3 cm 之間 (antagonistic activity index = 3) 和抑制圈大於 3 cm (antagonistic activity index = 4) 等 4 種，結果發現抑制圈大於 3 cm 者共有 2 株，分別篩選自杉林及田寮地區 (表 1)。本試驗依抑制圈大小選擇抑制效果最佳之菌株 35-2 與 43-21 進行後續試驗。

表 1. 不同地區採集之土壤放線菌抑制瘡痂病菌之效果。

Table 1. Effect of actinobacteria isolated from different locations with antagonistic activities against *Streptomyces europaeiscabiei* St1563 on ISP-4 medium.

Collected location	Number of isolates	Number of collected isolates with antagonistic activity against St1563				
		0 ^z	1	2	3	4
Jiaxian	10	6	0	3	1	0
Meinong	39	32	0	3	4	0
Tianliao	16	14	0	1	0	1
Yanchao	7	5	0	2	0	0
Shanlin	4	1	2	0	0	1
Namaxia	9	9	0	0	0	0

^z The antagonistic activity index was rated by the diameter of the inhibition zone: 0: no inhibition; 1: the diameter of inhibition zone < 1 cm; 2: 1 cm ≤ the diameter of inhibition zone < 2 cm; 3: 2 cm ≤ the diameter of inhibition zone < 3 cm; 4: the diameter of inhibition zone ≥ 3 cm.

不同培養時間對放線菌培養濾液拮抗 *S. europaeiscabiei* St1563 能力之影響

本試驗選擇菌株 35-2 與 43-21，進行不同培養時間對放線菌培養濾液拮抗 *S. europaeiscabiei* St1563 能力測定。將具有拮抗能力的 2 株土壤放線菌菌株 (35-2 與 43-21)，分別培養在 LB broth 小量培養 0、7、14 及 21 d 後，取其培養濾液於 ISP-4 培養基上進行對 *S. europaeiscabiei* St1563 之拮抗測試。結果顯示，培養 7、14 及 21 d 的 35-2 菌株濾液皆具有抑制 *S. europaeiscabiei* St1563 生長的效果，抑制效果以培養 7 d 之濾液最佳，抑制圈大小為 4.3 cm；其次為培養 14 及 21 d 之濾液，抑制圈分別為 2.3 及 2.9 cm，兩者之間並無顯著差異；而培養 0 d 之濾液，則無拮抗效果 (表 2)。於 43-21 菌株方面，培養 7 及 14 d 的濾液皆具有拮抗效果，以培養 7 d 之濾液最佳，抑制圈大小為 5.2 cm；其次為培養 14 d 之濾液，抑制圈為 2.3 cm；而培養 0 及 21 d 之濾液則無拮抗效果 (表 2)。

具防治馬鈴薯瘡痂病能力之放線菌菌株鑑定

利用 16S rRNA partial sequence 分析結果

表 2. 不同培養時間之鏈黴菌培養濾液於培養基上對瘡痂病菌 *Streptomyces europaeiscabiei* St1563 之拮抗效果。

Table 2. Effect of culture time for *Streptomyces* isolates 35-2 and 43-21 on antagonistic activity against *Streptomyces europaeiscabiei* St1563.

Culture duration (d)	Diameter of inhibition zone (cm)	
	35-2	43-21
0	0.0 c ^z	0.0 d
7	4.3 a	5.2 a
14	2.3 b	2.3 b
21	2.9 b	0.0 c

^z Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

顯示，菌株 35-2 之序列與 NCBI 資料庫中 *Streptomyces rochei* strain HBUM174096 (GenBank: EU841560) 相似度為 100%，而菌株 43-21 之序列與 NCBI 資料庫中 *Streptomyces neopeptinius* strain T41 (GenBank: KU324439) 相似度為 99%。根據上述分析結果，分別將菌株 35-2 及 43-21 初步鑑定為鏈黴菌 *S. rochei* (GenBank accession number MN784372) 與 *S. neopeptinius* (GenBank accession number MN784373)。

具拮抗能力鏈黴菌防治馬鈴薯瘡痂病菌之效果

將具有拮抗能力之土壤鏈黴菌菌株 35-2 及 43-21，分別利用培養 7 d 之濾液以土壤澆灌法進行對馬鈴薯瘡痂病防治的溫室試驗。結果顯示，澆灌處理菌株 35-2 之植株瘡痂病

罹病度為 28.0%，而澆灌處理菌株 43-21 之植株瘡痂病罹病度為 35.0%，兩處理之罹病度並無顯著差異，但皆明顯低於對照組之罹病度 61.5% (表 3)。由罹病指數分析馬鈴薯薯塊之瘡痂病斑發生程度，可發現對照組中共計 7 顆薯塊的罹病指數 ≥ 4 ，亦即高達 53.8% (7/13) 的薯塊 90% 以上之表面積皆為病斑覆蓋；而以菌株 35-2 及 43-21 澆灌之植株，則無薯塊之罹病指數 ≥ 4 。其中，多數薯塊為 10% 以下之表面積為病斑覆蓋 (表 3)。由此可證實，菌株 35-2 及 43-21 皆可有效降低馬鈴薯瘡痂病之病斑感染面積及罹病度 (圖 1)。

具拮抗能力鏈黴菌之培養濾液對馬鈴薯生長之影響

利用菌株 35-2 及 43-21 之培養濾液澆灌馬鈴薯植株，於處理後 5 wk 收取馬鈴薯之地上部測量其鮮重 (fresh weight)、株高、地下部薯塊鮮重 (tuber weight)，並觀察薯塊表面是否有瘡痂等病斑生成。結果顯示，施用拮抗菌株培養濾液之植株薯塊外觀正常，並無瘡痂病斑生成；施用菌株 35-2 培養濾液之植株鮮重平均為 33.1 g，與對照組的植株平均鮮重為 36.7 g 並無顯著差異；而施用菌株 43-21 培養濾液之植株鮮重平均為 31.8 g，較對照組稍微減少 (表 4)。株高方面，施用拮抗菌株培養濾液與對照組無顯著差異；而施用菌株 35-2 及 43-21 培養濾液之薯塊鮮重分別為 24.9 g 及 25.4 g，與對照組 (15.4 g) 相較則有顯著增加的情形 (表 4)。

表 3. 具拮抗能力之鏈黴菌於溫室防治馬鈴薯瘡痂病之效果。

Table 3. Efficacy of antagonistic *Streptomyces* isolates 35-2 and 43-21 on controlling potato common scab in a greenhouse.

Treatment	Total number of potato tubes	Disease index ^z						Disease severity ^y (%)
		0	1	2	3	4	5	
35-2	15	2	6	6	1	0	0	28.0 b ^x
43-21	16	1	6	5	4	0	0	35.0 b
CK (control)	13	1	2	2	1	4	3	61.5 a

^z Tubers were evaluated for disease severity on a rating scale: 0: no visible symptoms; 1–4: up to 10%, 40%, 60% and 90% of tuber surface infected, respectively; 5: heavy infections with > 90% of tuber surface infected.

^y Disease severity (%): $[(\sum \text{number of diseased tubes in each disease index} \times \text{disease index}) / (\text{total number of tubes inoculated} \times 5)] \times 100\%$.

^x Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at 5% by Fisher's least significant difference (LSD) test.

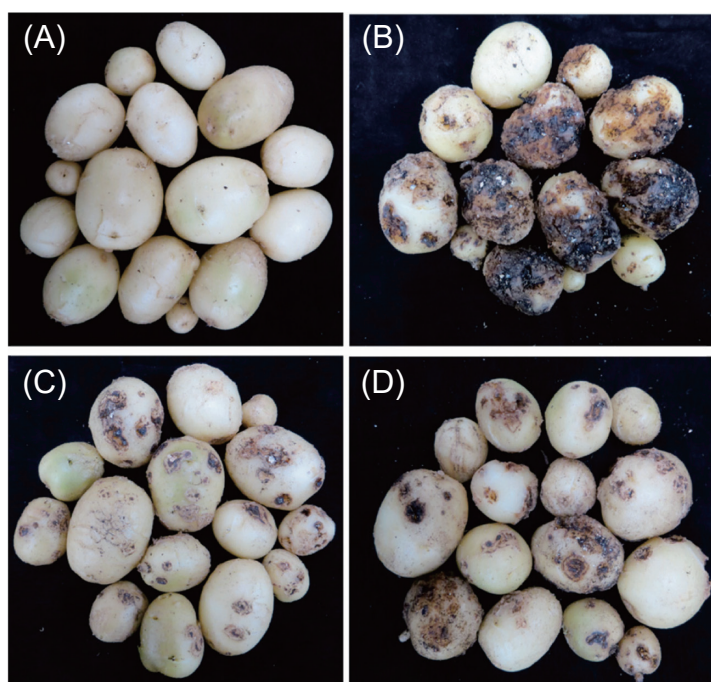


圖 1. 利用土壤拮抗菌於溫室防治馬鈴薯瘡痂病之效果。(A) 無菌水處理之對照組；(B) 接種 *Streptomyces europaeiscabiei* St1563；(C) 接種 *Streptomyces europaeiscabiei* St1563 並施用拮抗菌 35-2 菌株培養濾液；(D) 接種 *Streptomyces europaeiscabiei* St1563 並施用拮抗菌 43-21 菌株培養濾液。

Fig. 1. Effect of antagonistic actinobacteria on controlling potato common scab in a greenhouse. (A) Mock control; (B) inoculated with *Streptomyces europaeiscabiei* St1563; (C) treated with culture filtrates of 35-2 isolate and inoculated with *Streptomyces europaeiscabiei* St1563; and (D) treated with culture filtrates of 43-21 isolate and inoculated with *Streptomyces europaeiscabiei* St1563.

表 4. 拮抗鏈黴菌之培養濾液對馬鈴薯生長之影響。

Table 4. Effect of culture filtrates from antagonistic *Streptomyces* isolates 35-2 and 43-21 on growth of potato in greenhouse.

Treatment	Fresh weight (g) plant ¹	Plant height (cm)	Tuber weight (g) plant ¹	Tuber scab symptom
CK (control)	36.7 a ²	36.9 a	15.4 b	No
35-2	33.1 a	34.6 a	24.9 a	No
43-21	31.8 b	35.8 a	25.4 a	No

² Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at 5% by Fisher's least significant difference (LSD) test.

討論

馬鈴薯瘡痂病為世界馬鈴薯產區之重要細菌性病害之一，不僅影響馬鈴薯薯塊產量，亦影響外觀及市場價值。本研究自高雄市甲仙、美濃及田寮等地區之土壤分離得到 85 株放線菌菌株，其中 18 株菌株可於 ISP-4 培養基上抑制瘡痂病菌生長。從中選取拮抗性最佳之菌

株 35-2 及 43-21，進行放線菌菌液態培養濾液拮抗活性試驗及馬鈴薯瘡痂病防治試驗，結果顯示此 2 株拮抗菌可於培養基上抑制 *S. europaeiscabiei* 之生長，於溫室中亦可有效降低馬鈴薯瘡痂病之罹病度。菌株 35-2 與 43-21 經由 16S rRNA 序列分析比對後，發現分別和 *S. rochei* 與 *S. neopepcinnius* 具有高度的序列相似度。

鏈黴菌廣泛存在於土壤中，為放線菌科 (Actinomycetaceae) 中最大的一屬，已知可藉由抗生、競爭及超寄生等作用機制拮抗植物病原菌 (Schlatter *et al.* 2009)。過去已有研究證實利用 *Streptomyces diastatochromogenes* (Eckwall & Schottel 1997)、*Streptomyces violaceusniger* (Sarwar *et al.* 2019) 及其他無病原性鏈黴菌 (*Streptomyces* spp.) (Ryan *et al.* 2004; Wanner *et al.* 2014) 等作為生物防治菌，皆對 *S. scabiei* 具有拮抗的效果。而在其他馬鈴薯瘡痂病原菌之生物防治研究方面，Hiltunen *et al.* (2009) 指出 *S. griseoviridis* 與鏈黴菌菌株 346 (*Streptomyces* strain 346) 可有效防治 *S. turgidiscabiei* 引起之馬鈴薯瘡痂病。此外，Sarwar *et al.* (2018) 之研究證實鏈黴菌 (*Streptomyces* A1RT) 可產生抗生物質 isatropolone C，藉此抑制 *S. europaeiscabiei* 生長，同時也對多種馬鈴薯瘡痂病菌具有拮抗效果，包含 *S. turgidiscabiei*、*S. scabiei* 以及 *S. stelliscabiei*。本研究結果也顯示鏈黴菌菌株 35-2 與 43-21 可抑制 *S. europaeiscabiei* 生長，並於溫室試驗中有效降低馬鈴薯之罹病度，具有發展成為防治馬鈴薯瘡痂病之微生物製劑的潛力，未來將於田間進行實際應用並評估其可行性。另外，由於拮抗菌所分泌之酵素或二次代謝物可經由玻璃紙滲透至培養基中，進而抑制病原菌之生長，而培養濾液亦是利用拮抗菌產生的二次代謝物作為抑制病原菌生長之物質。因此，推測本研究篩選之拮抗菌其抗病機制可能為抗生作用，但提供拮抗活性之主要抗生物質為何，則需進一步分析確認。

鏈黴菌除了可作為生物防治菌之外，部分的鏈黴菌更具有促進植物生長或誘導植物產生抗病性的效果 (Schlatter *et al.* 2009)，因此鏈黴菌在生物防治應用上極具潛力。目前研究已證實 *S. rochei* 可作為生物製劑，對多種病原真菌具有防治的效果，如 *Rhizoctonia solani*、*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 及 *Botryosphaeria dothidea* 等。此外，亦有增加植物根長及植株乾重等促進植物生長的功效 (Kanini *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2016; Zamoun *et al.* 2017)。而 *S. neopepcinnius* 可對多種病原真菌表現廣泛性的拮抗效果，如 *Sphaerotheca fusca*、*As-*

pergillus carbonarius 及 *Rhizoctonia solani* 等，同時對番茄幼苗等植物的生長具有促進的效果 (Kim *et al.* 2007; Han *et al.* 2008; Goudjal *et al.* 2016)。本研究結果發現，利用鏈黴菌 35-2 與 43-21 菌株培養濾液澆灌之馬鈴薯植株，每株生產薯塊的重量明顯增加。因此，35-2 與 43-21 菌株除了具有拮抗馬鈴薯瘡痂病菌的能力外，亦具有增加馬鈴薯產量的潛力。

生物防治應用於田間時須面對許多挑戰，在不同的生長季節，或是在相同季節中於不同的田區中，生物防治菌之防治效果皆會受到影響。因每個季節及不同地區之環境條件如土壤特性、土壤溼度等都具有差異性，而環境亦會影響病原菌與拮抗菌之生長以及與寄主植物之間的相互作用，且田間微生物相複雜，常導致生物防治菌於施用後難以達到預期之病害防治效果。Wanner *et al.* (2014) 於 4 個不同地區之試驗田進行鏈黴菌對馬鈴薯瘡痂病之生物防治試驗，結果顯示僅有 3 個地區的試驗田能顯著地降低瘡痂病的罹病度，同時也發現馬鈴薯品種亦會影響拮抗菌的防治效果。於所測試的 3 種馬鈴薯品種中，以「育空黃金」(‘Yukon Gold’) 馬鈴薯的防治效果最佳，而對「大西洋」(‘Atlantic’) 馬鈴薯則出現瘡痂病徵更為嚴重的情形。Ryan *et al.* (2004) 利用具拮抗性的鏈黴菌防治馬鈴薯瘡痂病時，亦發現馬鈴薯品種會影響生物防治效果，造成上述現象之原因可能與馬鈴薯品種對病原菌的抗/感病程度有關 (Keinath & Loria 1991)。另外，生物防治菌於田間的使用方式亦會影響其生物防治的效果、栽培者使用的意願及經濟成本；將生物拮抗菌 *S. violaceusniger* 利用土壤澆灌的方式使用，於田間試驗之效果顯著，可降低 83.07% 之馬鈴薯瘡痂病罹病度 (Sarwar *et al.* 2019)，但實務操作上較為耗時費工；而利用介質與生物拮抗菌混拌後再黏附於薯塊表面等方式 (Hiltunen *et al.* 2009) 雖較為簡便，但仍需考慮生物拮抗菌黏附度是否足夠。為了兼顧生物防治菌於田間的使用效果以及栽培者使用上的簡便性，生物防治技術仍需精益求精，未來將對本研究篩選之鏈黴菌菌株 35-2 與 43-21 進行物理及化學等特性分析並研發適合之施用技術，以期能適時、適地且有效地把生物製劑導入作

物病害綜合管理體系中，使其發揮優異的防病功效。

隨著生態環境保護意識的抬頭與消費者對食品安全的追求，擬定友善環境的農業栽培管理策略，以維持農業永續經營已成為近年農業發展的主要目標。其中，推動生物防治技術即是主要的手段之一，本研究所篩選之鏈黴菌 35-2 與 43-21 兼具促進薯塊生長與有效降低馬鈴薯薯塊被瘡痂病菌感染的雙重效果，為具有發展為生物製劑潛能之拮抗菌。

誌謝

本研究工作承洪寶林先生提供土壤樣本及本研究室同仁林江美華小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

- Arseneault, T., C. Goyer, and M. Filion. 2015. *Pseudomonas fluorescens* LBUM223 increases potato yield and reduces common scab symptoms in the field. *Phytopathology* 105:1311–1317. doi:10.1094/PHYTO-12-14-0358-R
- Bouchek-Mechiche, K., L. Gardan, P. Normand, and B. Jouan. 2000. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: Description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:91–99. doi:10.1099/00207713-50-1-91
- Dees, M. W. and L. A. Wanner. 2012. In search of better management of potato common scab. *Potato Res.* 55:249–268. doi:10.1007/s11540-012-9206-9
- Eckwall, E. C. and J. L. Schottel. 1997. Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain PonSSII. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 19:220–225. doi:10.1038/sj.jim.2900455
- Edwards, U., T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde, and E. C. Böttger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17:7843–7853. doi:10.1093/nar/17.19.7843
- Flores-González, R., I. Velasco, and F. Montes. 2008. Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. *Plant Pathol.* 57:162–169. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01734.x
- Goth, R. W., K. G. Haynes, and D. R. Wilson. 1993. Evaluation and characterization of advanced potato breeding clones for resistance to scab by cluster analysis. *Plant Dis.* 77:911–914. doi:10.1094/PD-77-0911
- Goudjal, Y., M. Zamoum, A. Meklat, N. Sabaou, F. Mathieu, and A. Zitouni. 2016. Plant-growth-promoting potential of endosymbiotic actinobacteria isolated from sand truffles (*Terfezia leonis* Tul.) of the Algerian Sahara. *Ann. Microbiol.* 66:91–100. doi:10.1007/s13213-015-1085-2
- Han, J. H., I. C. Hwang, S. H. Cho, C. Jang, N. G. Kim, S. H. Yu, Y. M. Yu, and S. B. Kim. 2008. Description of *Streptomyces neopeptini* sp. nov., an actinobacterium with broad spectrum antifungal activities. *J. Microbiol.* 46:295–299. doi:10.1007/s12275-008-0011-8
- Hiltunen, L. H., T. Ojanperä, H. Kortemaa, E. Richter, M. J. Lehtonen, and J. P. T. Valkonen. 2009. Interactions and biocontrol of pathogenic *Streptomyces* strains co-occurring in potato scab lesions. *J. Appl. Microbiol.* 106:199–212. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03992.x
- Hiltunen, L. H., J. Kelloniemi, and J. P. T. Valkonen. 2014. First report of *Streptomyces europaeiscabiei* causing common scab on potato in Finland. *Plant Dis.* 98:1267. doi:10.1094/PDIS-03-14-0278-PDN
- Huang, C. W. 2008. Potato common scab caused by *Streptomyces scabies* in Taiwan- Biological characteristics of the pathogen and an attempted biocontrol by antagonistic *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* WG6-14. Master Thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 92 pp. (in Chinese with English abstract)
- Kanini, G. S., E. A. Katsifas, A. L. Savvides, and A. D. Karagouni. 2013. *Streptomyces rochei* ACTA1551, an indigenous Greek isolate studied as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *BioMed Res. Intl.* 2013:387230. doi:10.1155/2013/387230
- Keinath, A. P. and R. Loria. 1991. Effects of inoculum density and cultivar resistance on common scab of potato and population dynamics of *Streptomyces scabies*. *Amer. Potato J.* 68:515–524. doi:10.1007/BF02853768
- Kim, Y. S., H. M. Kim, C. Chang, I. C. Hwang, H. Oh, J. S. Ahn, K. D. Kim, B. K. Hwang, and B. S. Kim. 2007. Biological evaluation of neopeptins isolated from a *Streptomyces* strain. *Pest Manag. Sci.* 63:1208–1214. doi:10.1002/ps.1450

- Lambert, D. H. and R. Loria. 1989a. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:393–396. doi:10.1099/00207713-39-4-393
- Lambert, D. H. and R. Loria. 1989b. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol. 39:387–392. doi:10.1099/00207713-39-4-387
- Larkin, R. P., C. W. Honeycutt, T. S. Griffin, O. M. Olanaya, J. M. Halloran, and Z. He. 2011. Effects of different potato cropping system approaches and water management on soilborne diseases and soil microbial communities. Phytopathology 101:58–67. doi:10.1094/PHYTO-04-10-0100
- Leiminger, J., M. Frank, C. Wenk, G. Poschenrieder, A. Kellermann, and A. Schwarzfischer. 2013. Distribution and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Germany. Plant Pathol. 62:611–623. doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02659.x
- Lin, C., C. H. Tsai, P. Y. Chen, C. Y. Wu, Y. L. Chang, Y. L. Yang, and Y. L. Chen. 2018a. Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. PLoS One 13:e0196520. doi:10.1371/journal.pone.0196520
- Lin, C. Y., H. F. Ni, and C. W. Huang. 2018b. First report of common scab on potato caused by *Streptomyces europaeiscabiei* in Taiwan. Plant Dis. 102:818. doi:10.1094/PDIS-05-17-0667-PDN
- Meng, Q., L. E. Hanson, D. Douches, and J. J. Hao. 2013. Managing scab diseases of potato and radish caused by *Streptomyces* spp. using *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 and other biomaterials. Biol. Control 67:373–379. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.09.009
- Miyajima, K., F. Tanaka, T. Takeuchi, and S. Kuninaga. 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. Intl. J. Syst. Bacteriol. 48:495–502. doi:10.1099/00207713-48-2-495
- Ryan, A. D., L. L. Kinkel, and J. L. Schottel. 2004. Effect of pathogen isolate, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control. Biocontrol Sci. Technol. 14:301–311. doi:10.1080/09583150410001665187
- Sarwar, A., Z. Latif, S. Zhang, J. Zhu, D. L. Zechel, and A. Bechthold. 2018. Biological control of potato common scab with rare Isatropolone C compound produced by plant growth promoting *Streptomyces* A1RT. Front. Microbiol. 9:1126. doi:10.3389/fmicb.2018.01126
- Sarwar, A., Z. Latif, S. Zhang, J. Hao, and A. Bechthold. 2019. A potential biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* AC12AB for managing potato common scab. Front. Microbiol. 10:202. doi:10.3389/fmicb.2019.00202
- Schlatter, D., A. Fubuh, K. Xiao, D. Hernandez, S. Hobbie, and L. Kinkel. 2009. Resource amendments influence density and competitive phenotypes of *Streptomyces* in soil. Microb. Ecol. 57:413–420. doi:10.1007/s00248-008-9433-4
- Song, J., S. C. Lee, J. W. Kang, H. J. Baek, and J. W. Suh. 2004. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S–23S rDNA internally transcribed spacer sequences. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:203–209. doi:10.1099/ijs.0.02624-0
- Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21:4153–4154. doi:10.1093/nar/21.17.4153
- Wanner, L. A. 2009. A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America. Amer. J. Pot. Res. 86:247–264. doi:10.1007/s12230-009-9078-y
- Wanner, L. A., W. W. Kirk, and X. S. Qu. 2014. Field efficacy of nonpathogenic *Streptomyces* species against potato common scab. J. Appl. Microbiol. 116:123–133. doi:10.1111/jam.12336
- Zamoum, M., Y. Goudjal, N. Sabaou, F. Mathieu, and A. Zitouni. 2017. Development of formulations based on *Streptomyces rochei* strain PTL2 spores for biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato seedlings. Biocontrol Sci. Technol. 27:723–738. doi:10.1080/09583157.2017.1334257
- Zhang, Q., D. Yong, Y. Zhang, X. Shi, B. Li, G. Li, W. Liang, and C. Wang. 2016. *Streptomyces rochei* A-1 induces resistance and defense-related responses against *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit during storage. Postharvest Biol. Technol. 115:30–37. doi:10.1016/j.postharvbio.2015.12.013

Identification and Evaluation of Antagonistic Actinobacteria on Controlling Potato Common Scab

Ching-Yi Lin^{1,*}, Hui-Fang Ni², and Hui-Ju Lin³

Abstract

Lin, C. Y., H. F. Ni, and H. J. Lin. 2020. Identification and evaluation of antagonistic actinobacteria on controlling potato common scab. *J. Taiwan Agric. Res.* 69(2):122–131.

Potato common scab is an economically important disease that is caused by several members of the genus *Streptomyces* in the world. As no effective pesticides and limited results of crop rotation and resistant potato cultivars for managing the disease, this study explored the possibility of using biological control. A total of 85 isolates of actinobacteria were isolated from soil from six different locations in Kaohsiung City. Cellophane paper antibiotic method and bacterial culture filtrates application were conducted to determine antagonistic activity against *Streptomyces europaeiscabiei*. Isolates 35-2 and 43-21 strongly inhibited *S. europaeiscabiei* growth in both assays. When potato plants were drenched with culture filtrates of isolates 35-2 and 43-21, respectively, significantly reduced potato common scab incidence was observed in pot assays. The disease severity was 28% after isolate 35-2 treatment and 35% after isolate 43-21 treatment. In addition, isolates 35-2 and 43-21 increased potato tubers weight in pot assays. These results suggested that isolates 35-2 and 43-21 could provide a dual benefit by decreasing potato common scab disease severity and increasing potato yield as an effective biological control agent. Based on 16S rRNA sequencing analysis, the two antagonistic isolates 35-2 and 43-21 showed a sequence identity of 100% and 99% with *Streptomyces rochei* and *Streptomyces neopeptinius*, respectively.

Key words: Potato common scab, *Streptomyces* spp., Biologic control.

Received: September 5, 2019; Accepted: December 17, 2019.

* Corresponding author, e-mail: eris2024@dns.caes.gov.tw

¹ Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

² Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

³ Project Assistant, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.